

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 657 011

②1 N° d'enregistrement national :

90 00508

⑤1 Int Cl⁵ : A 61 K 35/78; C 12 N 9/02

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 17.01.90.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 19.07.91 Bulletin 91/29.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : SOCIETE D'ENGRAIS COMPOSES
MINERAUX ET AMENDEMENTS S.E.C.M.A. Société
anonyme — FR.

⑦2 Inventeur(s) : Briand Xavier.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Cabinet Beau de Loménie.

⑤4 Utilisation d'extraits de plantes de bord de mer pour la préparation de compositions pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires ou à usage agricole.

⑤7 La présente invention concerne l'utilisation d'extraits de plantes de bord de mer obtenus par extraction en phase liquide et séchage éventuel pour la préparation de compositions pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires ou à usage agricole à activité antiradicalaire. Les plantes utilisées sont choisies parmi la Criste Marine, l'Inule fausse criste et la Salicorne.

FR 2 657 011 - A1



Utilisation d'extraits de plantes de bord de mer pour la préparation de compositions pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires ou à usage agricole

05 La présente invention a pour objet une nouvelle utilisation des extraits de plantes de bord de mer et trouve notamment application dans la préparation de compositions pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires ou à usage agricole, à activité antiradicalaire.

10 On sait que les extraits de plantes de bord de mer, en raison de leurs propriétés variées, ont été proposés dans de nombreuses applications pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires ou agricoles.

15 La présente invention est basée sur la découverte inattendue que des extraits de certaines plantes de bord de mer présentent une activité antiradicalaire vis-à-vis du radical superoxide. On sait que les ions superoxide produits au cours de réactions d'oxydation sous l'effet d'oxygène moléculaire sont très actifs et attaquent notamment les protéines et les acides nucléiques.

20 Par conséquent, l'invention présente un intérêt remarquable notamment pour la protection des cellules de la peau.

25 L'invention trouve également application pour la préparation de compositions alimentaires, en raison du pouvoir protecteur de ces extraits de plantes vis-à-vis des acides gras poly insaturés.

Les plantes utilisées conformément à la présente invention sont choisies parmi la Criste Marine, l'Inule fausse criste et la Salicorne.

30 Il a été découvert que toutes ces plantes n'ont pas le même degré d'activité antiradicalaire.

La préparation des extraits de plantes utilisés conformément à l'invention peut être effectuée par des procédés classiques d'extraction en phase liquide, notamment extraction aqueuse à pH contrôlé et extraction en solvant polaire, éventuellement combinés à des procédés de concentration par séchage sous vide ou

par osmose inverse ou de concentration et purification par chromatographie ou par ultrafiltration.

La méthode de mesure du pouvoir antiradicalaire est celle de Winterbourn (J. Lab. Clin., Med. 85.337).

05 L'invention sera illustrée par les exemples non limitatifs suivants.

A. Exemples de préparation d'extraits de plantes conformes à la présente invention :

10 Exemple 1

On incorpore 100 g de Criste Marine dans 200 ml d'eau.

On effectue un broyage à l'aide d'un broyeur type ultra turrax pendant 10 min à température ambiante.

15 L'extraction est effectuée sous légère agitation pendant 24 h à température ambiante, puis la solution obtenue est filtrée.

On obtient un filtrat qui se présente sous forme de poudre.

Exemple 2

20 On incorpore 100 g de Inule fausse criste dans 200 ml d'eau.

Le broyage est effectué dans les mêmes conditions qu'à l'exemple 1.

L'extraction est réalisée sous légère agitation pendant 12 h à 50°C, puis la solution est filtrée.

25 Exemple 3

On incorpore 100 g de Criste Marine dans un mélange hydroalcoolique constitué par 180 ml d'eau et 20 ml d'alcool éthylique.

30 Le broyage est effectué dans les mêmes conditions que celles décrites à l'exemple 1.

L'extraction est réalisée sous légère agitation pendant 12 h à 50°C, puis la solution obtenue est filtrée.

Exemple 4

35 On incorpore 100 g de Criste Marine dans 200 ml d'eau.

Un broyage et une extraction sont réalisées dans les conditions définies à l'exemple 1, puis la solution est filtrée.

Sur le filtrat, on effectue une évaporation sous vide à température ambiante pour obtenir un extrait parfaitement sec.

Exemple 5

05 On incorpore 100 g de Inule fausse criste dans un mélange hydroalcoolique comportant 180 ml d'eau et 20 ml d'alcool éthylique.

Un broyage est effectué dans les conditions définies à l'exemple 1, puis on réalise une extraction sous légère agitation pendant 8 h à 40°C, puis la solution est filtrée.

10 Exemple 6

On incorpore 100 g de Salicorne dans un mélange hydroalcoolique constitué de 180 ml d'eau et 20 ml d'alcool isopropylique.

15 Un broyage est effectué dans les conditions de l'exemple 1, puis on effectue une extraction sous légère agitation pendant 24 h à 30°C et la solution est filtrée.

Exemple 7

20 On incorpore 100 g de Criste Marine dans un mélange hydroalcoolique constitué de 100 ml d'eau et 100 ml de propylène-glycol.

Un broyage est effectué dans les conditions de l'exemple 1, puis on réalise une extraction sous légère agitation pendant 24 h à 20°C, et la solution obtenue est filtrée.

Exemple 8

25 On incorpore 100 g de Criste Marine dans un mélange hydroalcoolique constitué de 190 ml d'eau et 10 ml d'alcool éthylique.

30 Un broyage est réalisé dans les conditions définies à l'exemple 1, puis on effectue une extraction sous légère agitation pendant 24 h à 20°C et la solution ainsi obtenue est filtrée.

Exemple 9

On incorpore 100 g de Inule fausse criste dans un mélange constitué de 180 ml d'eau et 20 ml de propylèneglycol.

35 Un broyage est effectué dans les conditions définies à l'exemple 1, puis on réalise une extraction sous légère agitation pendant 12 h à 40°C, et la solution ainsi obtenue est filtrée.

Exemple 10

On incorpore 100 g de Inule fausse criste dans un mélange hydroalcoolique comportant 160 ml d'eau et 40 ml d'alcool éthylique.

05 Un broyage est réalisé dans les conditions définies à l'exemple 1, puis on effectue une extraction sous légère agitation pendant 8 h à 50°C et on filtre la solution obtenue.

Exemple 11

10 On incorpore 100 g de Criste Marine dans un mélange hydroalcoolique constitué de 190 ml d'eau et 10 ml d'alcool éthylique.

Un broyage est effectué dans les conditions définies à l'exemple 1, puis on réalise une extraction sous légère agitation pendant 48 h à 50°C et la solution ainsi obtenue est filtrée.

15 Exemple 12

On incorpore 100 g de Criste Marine dans un mélange hydroalcoolique constitué de 180 ml d'eau et 20 ml d'alcool éthylique.

20 Un broyage est effectué dans les conditions définies à l'exemple 1, puis on réalise une extraction sous légère agitation pendant 48 h à 30°C et on filtre la solution obtenue.

Exemple 13

25 On plonge 100 g de Criste Marine, pendant environ 30 min dans une solution hydroalcoolique afin d'inactiver par saponification la lipoxygénase et la catalase et d'éliminer la majorité des lipides.

Après lavage, on effectue une extraction dans 200 ml d'eau pendant 12 h à température ambiante.

30 L'extract ainsi obtenu est alors centrifugé à environ 3 000 g puis purifié de la façon suivante :

On ajoute au centrat du sulfate d'ammonium solide en quantité nécessaire pour obtenir une concentration finale de 60 % de la saturation à 5°C. Le précipité est ensuite éliminé par centrifugation (2000-3000 g).

35 Du sulfate d'ammonium est ajouté au centrat (80 % du seuil de saturation). Une fois mélangé, le précipité est récupéré

par centrifugation. Après avoir soigneusement éliminé les traces de surnageant, le précipité est redissous dans une quantité aliquote d'eau tamponnée (pH 8,5).

05 La solution obtenue est alors appliquée sur une colonne remplie de QAE SEPHAROSE équilibré avec le même tampon. L'extrait est élué. Les fractions contenant plus de 50 % de l'activité maximale sont combinées et concentrées. La fraction réduite est filtrée sur un gel de SEPHACRYL S-300 tamponné à pH 7,8 avec une solution de phosphate de potassium 10 mM. Les fractions contenant plus de 10 50 % de l'activité maximale sont combinées et concentrées jusqu'à obtenir une concentration en phosphate de 1 mM (pH 7,8).

Le matériel est alors chromatographié sur une colonne d'hydroxyapatite tamponnée à pH 7,8 avec une solution de phosphate 1 mM. Après élution, l'extrait purifié est concentré.

15

B. Détermination de l'activité antiradicalaire des extraits de plantes, conformes à l'invention

La détermination de l'activité antiradicalaire des extraits de plantes conformes à l'invention a été réalisée en utilisant la technique de Winterbourn. Cette technique est basée sur 20 l'inhibition, par l'enzyme de la réaction de réduction du nitroblue tétrazolium (NBT) provoquée par les radicaux superoxide libres.

Les radicaux libres sont générés par la riboflavine en 25 présence de lumière.

Protocole opératoire

On introduit dans un tube à essais :

- 30 . 0,2 ml d'EDTA
- . 0,1 ml de NBT
- . 0,1 ml de solution enzymatique contenant entre 5 et 10 μ m de protéine
- . 2,6 ml de tampon phosphate.

35 On incube quelques minutes devant une source lumineuse afin de réchauffer aux environs de 30°C le mélange réactionnel.

On rajoute 50 µl de ribloflavine et on place à nouveau les tubes devant la source lumineuse. Au bout de 12 min, on lit la D0 à 560 nm contre de l'eau distillée.

Un tube témoin dans lequel l'enzyme est remplacée par de l'eau distillée et soumis au même protocole expérimental.

On détermine ainsi le pourcentage d'inhibition (Pi) de la réduction du NBT à l'aide des valeurs de D0 à 560 nm obtenues pour le tube réactionnel et le tube témoin, selon la formule

$$P_i = \left(1 - \frac{D_0 \text{ tube réactionnel}}{D_0 \text{ tube témoin}}\right) \cdot 100$$

La valeur de Pi obtenu doit être proche de 50 % d'inhibition de la réduction du NBT.

Les résultats sont exprimés en unités NBT par gramme de plantes fraîches.

Une unité NBT par gramme est égale à

$$\frac{10^6}{Q_{50}}$$

où Q_{50} est la quantité d'enzymes en µg qui provoque 50 % d'inhibition de la réduction du NBT.

En utilisant la méthode qui vient d'être décrite, on a mesuré l'activité antiradicalaire des extraits de plantes obtenus aux exemples 1 à 13.

Les résultats obtenus ont été regroupés selon la nature de l'extrait de plantes au tableau I.

Comme le montre ce tableau, l'activité antiradicalaire est variable; de très bons résultats sont obtenus avec les extraits de Criste Marine et de Inule fausse criste.

L'extrait sec de Criste Marine obtenu à l'exemple 4 présente une activité antiradicalaire remarquable.

Des résultats très intéressants ont été également obtenus avec des extraits obtenus en soumettant le filtrat de l'exemple 1 à une concentration par ultrafiltration, par osmose inverse et par chromatographie.

TABLEAU I

05	Nature de la plante utilisée	Activité antiradicalaire Unités NTB par gramme de plante fraîche
	Criste Marine	44 800
	Criste Marine (extrait sec)	510 000
	Inule fausse criste	31 500
10	Salicorne	1 500

Les extraits de plantes conformes à l'invention ne sont pas toxiques (par voie orale la DL_{50} est supérieure à 10 g/kg). Les tests d'irritation cutanée et d'irritation oculaire ont démontré que ces extraits ne sont pas irritants.

D'une façon générale, les extraits de plantes conformes à l'invention peuvent être utilisés pour la préparation de compositions pharmaceutiques radioprotectrices, antiscélérodermiques, anti-inflammatoires (polyarthrite, rumathoïde, arthrose, lupus érythémateux) ou utiles pour le traitement de lésions et brûlures dermiques, de dessèchement cutané, d'atonie cutanée ou encore de dermatoses purigineuses.

Dans cette application, on choisira une forme d'administration permettant un usage externe. L'extrait utilisé peut être pur ou dilué jusqu'à 5 %.

Les compositions cosmétiques incorporant des extraits de plantes conformes à l'invention conviennent particulièrement pour la protection du derme provenant notamment de la protection des acides nucléiques, du collagène de l'acide hyaluronique, des lipides membranaires et des protéines.

On envisage notamment l'élaboration de compositions cosmétiques destinées à la protection contre les réactions phototoxiques, contre l'agression des UV ou au traitement d'érythème actinique.

Dans le domaine alimentaire, l'invention permet la réalisation de compositions antioxydantes et efficaces contre la

peroxydation des lipides, la dénaturation des enzymes ou la dépolymérisation des polysaccharides. Ces compositions permettent notamment la préservation de la qualité des fruits et des légumes.

05 Dans le domaine agricole, l'invention permet la réalisation de compositions destinées à améliorer la conservation des graines, fruits, légumes, tubercules et ensilages ou encore à protéger des germinations ou des culutres contre les réactions d'oxydation liées à différents stress (hydrique, froid, osmotiques, carences en éléments nutritifs, pollutions, traitements pesticides).

10 On donnera ci-après, à titre illustratif des exemples de compositions conformes à l'invention.

Crème traitante :

	- Cyclogol NI	: 10 %
15	- Huile minérale "Carnation"	: 15 %
	- Huile de lanoline	: 0,25 %
	- Oléate de polypropylène glycol 2000	: 5 %
	- Extrait aqueux de Criste Marine	: 10 %
	- Parfum	: 0,2 %
20	- Paraben	: 0,1 %
	- Eau	: 59,45 %

Le cyclogol NI de la Société WITCO est un mélange d'alcool cétéarylique et de cétéareth 20.

25

Schampooing :

	- Lauryl sulfate de triéthanolamine	: 15 %
	- Diéthanolamide de coprah	: 2 %
	- Extrait aqueux de Inule fausse criste	: 4 %
30	- Parfum chèvrefeuille	: 0,2 %
	- Paraben	: 0,1 %
	- Eau	: 78,7 %

Bain moussant :

35	- Hemi ester sulfosuccinique	: 45 %
	- Diéthanolamide de coprah	: 2,5 %

	- Extrait aqueux de Salicorne	: 10 %
	- EDTA 4 Na	: 1 %
	- Parfum	: 0,3 %
	- Paraben	: 0,1 %
05	- Colorant E 131	: 0,01 %
	- Eau	: 41,1 %

Lotion solaire :

	- Giv-Tan F (Givaudan)	: 2 %
10	- Oléate de polypropylène 2000	: 25 %
	- Extrait hydroalcoolique de Criste Marine	: 10 %
	- Alcool éthylique	: 62,7 %
	- Parfum	: 0,3 %

15 Lait de toilette :

	- Chlorure de stéapyrium	: 1 %
	- Huile Carnation	: 4 %
	- Monostéarate de glycérol	: 2 %
	- Glycérine	: 4 %
20	- Extrait glycolique de Criste Marine	: 4 %
	- Parfum	: 0,3 %
	- Eau	: 84,7 %

Mousse à raser :

25	- Acide stéarique	: 6,8 %
	- Triéthanolamine	: 3,7 %
	- Propylène glycol 2000	: 0,6 %
	- Lauramide	: 0,5 %
	- Distéarate de polyéthylène glycol 150	: 0,2 %
30	- Propylène glycol stéarate	: 1 %
	- Extrait glycolique de Criste Marine	: 3 %
	- Parfum	: 0,4 %
	- Glycérol	: 1 %
	- Eau	: 82,8 %

Crème radio protectrice :

	- Monostéarate de glycérol	: 5 %
	- Stéarine	: 3,6 %
	- Huile de paraffine	: 7 %
05	- Palmitate de cétyle	: 0,4 %
	- Alginate de triéthanolamine	: 0,8 %
	- Extrait glycolique de Criste Marine	: 9 %
	- Triéthanolamine	: 0,4 %
	- Parfum	: 0,1 %
10	- Paraben	: 0,1 %
	- Eau purifiée et déminéralisée	: 73,6 %

15 Cette crème peut être appliquée matin, midi et soir en couches épaisses sur et autour des régions traitées. On fera pénétrer cette crème en massant légèrement.

Crème anti-sénescence :

	- Cyclogol NI	: 4,5 %
	- Cire d'abeille	: 13 %
20	- Extrait glycolique de Criste Marine	: 12 %
	- Lanoline	: 3 %
	- Huile minérale Carnation	: 12 %
	- Borax	: 1,5 %
	- Parfum	: 0,2 %
25	- Paraben	: 0,1 %
	- Eau	: 53,7 %.

Fertilisant foliaire Zn :

	- Eau	: 34,6 %
30	- Sulfate de zinc (à 21% Zn)	: 23 %
	- Potasse	: 0,4 %
	- Chlorure de magnésium à 22,5% MgO	: 12 %
	- Extraits de bêtaïnes (dosant 10% bêtaïnes)	: 20 %
	- Extrait aqueux de Criste Marine	: 10 %

Fertilisant foliaire MnCu :

- Sulfate de cuivre (25% Cu) : 6,8 %
- Sulfate de manganèse (30,8% Mn) : 2,7 %
- Chlorure de magnésium (22,5% MgO) : 24,4 %
- 05 - Extrait de bêtaïnes (dosant 10% bêtaïnes) : 16,5 %
- Extrait aqueux de Criste Marine : 49,6 %.

Conservateur de fleurs coupées :

- Extrait aqueux de Criste Marine : 5 à 50 %
- 10 - Sel de cobalt (sulfate de cobalt, chlorure de cobalt, nitrate de cobalt) : 0,2 mM
- Eau q.s.p.

Conservateur fruits légumes tubercules :

- 15 - Extrait aqueux de Criste Marine : 10 à 95 %
- Acide ascorbique : 5 - 500 mM
- Acide polyphosphate : 0,1 - 5 %.

Tablette diététique :

- 20 - Extrait sec de Criste Marine : 200 mg
- Cellulose cristalline : 47 mg
- Dextrine : 5 mg
- Lactose : 20 mg
- Carboxyméthylcellulose : 5 mg
- 25 - Talc : 3 mg.

Boisson diététique :

- Extrait de Criste Marine : 1 à 20 %
- Parfum (citron, orange, ...) : 0,5 à 1,0 %
- 30 - Acide citrique : 0,5 à 1,0 %
- Eau q.s.p. 1000

REVENDEICATIONS

05 1. Utilisation d'extraits de plantes de bord de mer obtenus par extraction en phase liquide et séchage éventuel, pour la préparation de compositions pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires ou à usage agricole à activité antiradicalaire.

2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que les plantes utilisées sont choisies parmi la Criste Marine, l'Inule fausse criste et la Salicorne.

10 3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que l'extrait de plante utilisé est obtenu par extraction aqueuse à pH contrôlé ou par extraction en solvant polaire, notamment hydroalcoolique ou glycolique, et est éventuellement concentré par séchage sous vide, osmose inverse, chromatographie ou ultrafiltration.

15 4. Compositions cosmétiques, alimentaires ou à usage agricole à activité antiradicalaire, caractérisées en ce qu'elles contiennent un extrait de plante de bord de mer obtenu par extraction en phase liquide, et séchage éventuel.

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FR 90 00 508

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	RESSOURCES MEDICINALES DE LA FLORE FRANCAISE, Tome 1, pages 389-390 ; G. GARNIER et al. ; "Salicornia Herbacea" * en entier *	1-4
X	RESSOURCES MEDICINALES DE LA FLORE FRANCAISE, Tome 2, pages 1 358-1 361 ; G. GARNIER et al. : "Inula Helenium". * en entier *	1-4
X	RESSOURCES MEDICINALES DE LA FLORE FRANCAISE, Tome 2, pages 1 361-1 362 ; G. GARNIER et al. : "Pulicaria dysente- rica". * en entier *	1-4
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4)
		A 61 K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
08/04/91		C. JUPIN
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		